

可溶性 TRAIL 蛋白的高密度培养及补料策略研究

章 越¹ 沈亚领^{1*} 夏小霞¹ 孙爱友¹ 魏东芝^{1*}
周劲松² 张国钧² 王梁华³ 焦炳华³

¹(华东理工大学生物化学研究所,生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237)

²(上海恰尔生物技术有限公司,上海 200336)

³(第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,上海 200433)

摘 要 采用分批补料的方法高密度培养重组大肠杆菌 C600/pBV-TRAIL 制备可溶性 TRAIL 蛋白,优化发酵工艺,探索简单高效的分离纯化方法并测定蛋白生物活性。通过比较几种不同的补料策略:间歇流加、DO-stat、pH-stat,摸索了一种流加策略,即 DO-stat-pH-stat 组合流加,有效的避免了发酵过程中,尤其是诱导表达阶段乙酸积累的增加,使 TRAIL 蛋白在高密度培养条件下,得到高效表达。菌体密度最终达到 300g/L (WCW) 以上,可溶性 TRAIL 蛋白占菌体总蛋白的 4.2%,含量为 1.1g/L。在整个发酵过程中,乙酸浓度接近于 0,且未使用任何特殊手段,如纯氧、加压等,简化了发酵工艺,降低了发酵成本,为 TRAIL 的工业化生产创造了条件。

关键词 重组大肠杆菌,分批补料,发酵,TRAIL,分离纯化

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0408-06

TRAIL,即肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是 TNF 家族成员之一,又称凋亡素 2 配体(apoptotin 2 ligand, Apo-2L)。它具有良好的抗肿瘤效果,同时对正常组织和细胞代谢没有影响,因此成为国内外研究的热点^[1-2]。

大肠杆菌一直因为具有容易培养、生长速度快、遗传学资料丰富等特点,作为重组蛋白的表达系统而被广泛使用。高密度培养技术(High Cell-Density Culture, HCDC)的出现^[3-5],大幅度提高了重组蛋白的产量和产率,降低了发酵成本,为重组大肠杆菌的应用提供了更为广阔的空间,大量重组蛋白通过该表达系统得到高效表达^[6-7]。重组大肠杆菌高密度培养普遍采用分批补料(fed-batch),主要包括指数流加、DO-stat^[8]和 pH-stat^[9]等几种流加方式。每种流加策略,相对于其他策略,都不可避免的具有某些优势和局限性。例如 DO-stat 虽然可以提供较大的初始菌体得率和稳定的过程控制,避免溶氧的抑制,但同时发酵过程中 K_{La} 的波动,会对补料速率和比底物消耗速率产生不利影响,这种波动往往出现在诱导阶段^[10]。因此,选择合适的流加策略,创造适

合菌体生长的条件,常常成为达到高密度和高表达的关键。我们通过对几种不同流加策略的比较,确定了一种特殊的补料策略,避免了乙酸的积累,成功地在高密度下高效表达出具有生物活性的 TRAIL 蛋白,为进一步放大打下基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:重组大肠杆菌 C600/pBV-TRAIL 由第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室构建,上海恰尔生物技术有限公司提供。

1.1.2 培养基:

平皿培养基(g/L):蛋白胨 10、酵母粉 5、NaCl 5、琼脂 20。摇瓶培养基(g/L):蛋白胨 5、酵母粉 5、NaCl 5、葡萄糖 5。发酵培养基(g/L):蛋白胨 10、酵母粉 10、葡萄糖 10、 NaH_2PO_4 2、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7、 K_2HPO_4 3 H_2O 4、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.2、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.25 和金属离子。补料培养基(g/L)(1)葡萄糖 700(2)蛋白胨 175、酵母粉 175、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.5。

1.1.3 设备和试剂:Bioengineering 公司 3.7L 发酵系统和 B. Braun 公司 Biostat-B 5L 发酵系统,蛋白胨、酵

收稿日期 2003-10-29,修回日期 2004-01-14。

基金项目 国家重大科技专项基金资助(No.2002AA2Z345A)。

* 通讯作者。Tel 86-21-64250068; Fax 86-21-64250068; E-mail zhangyue@ecit.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

母粉为 OXOID 公司产品,其余为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 培养方法:

(1) 灭菌方法:发酵培养基(除磷酸盐)加入发酵罐中,在位灭菌,121℃灭菌 20min,磷酸盐和补料培养基分别溶解后,121℃灭菌 30min,发酵培养基接种前加入氨苄青霉素至 100 μ g/mL。

(2) 菌株活化方法:取 -70℃ 保存菌株甘油管,二次摇瓶活化(30℃,220r/min,10h)后,接种于平皿中,4℃ 保存,可用 4 周。

(3) 种子制备方法:取 4℃ 保存平板转接入另一平皿中,30℃ 培养 16h,然后挑单菌落于 100mL 摇瓶培养基中,30℃,220r/min 过夜培养。

(4) 摇瓶实验:

乙酸对表达的影响:在摇瓶(500mL)中加入 50mL LB 培养基,30℃、220r/min 培养 8h,达到一定密度后,开始诱导,诱导前在不同的摇瓶中加入不同浓度乙酸钠溶液(灭菌)至不同浓度(g/L):0、5、10、15、20,42℃ 诱导 4h,收集菌体后,测定可溶性 TRAIL 蛋白的表达量。诱导时间的确定:在摇瓶(500mL)中加入 50mL LB 培养基,30℃、220r/min 培养 8h,达到一定密度后,开始诱导,分别诱导不同时间,收集菌体后,测定可溶性 TRAIL 蛋白的表达量。

(5) 发酵罐培养:发酵采用 B. Braun 公司 Biostat-B 5L 发酵罐和 Bioengineering 公司 3.7L 发酵罐,初始发酵液体积分别为 2.5L 和 1.5L,5% 接种量接入种子液,通气量 1vvm,发酵温度为 30℃,发酵分为三个阶段,第一阶段为分批培养(Batch)阶段,溶氧逐渐下降,分步提高转速,控制溶氧在 30% 以上,当基础料中葡萄糖耗尽,溶氧和 pH 上升后,进入分批补料(Fed-batch)阶段,串联(cascade)溶氧和搅拌转速,控制溶氧 20%,同时按不同策略流加葡萄糖和氮源,维持菌体生长,当平均比生长速率小于 0.05h⁻¹后,开始诱导(Induce)阶段,42℃ 诱导 4h 后,放罐。整个发酵过程中,用 25% 氨水维持 pH 在 7.0 左右,每 2 小时取样 1 次,用于各种参数的检测,以下皆同。

(6) 补料策略:

间歇流加:间隔 30s,流速 0.38mL/min,流加葡萄糖,并按固定比例,流加氮源,必要时切换至手控。DO-stat 流加:根据菌体生长需要和发酵体积的变化,在恒定溶氧的条件下,近似指数流加葡萄糖和氮源,控制平均比生长速率在 0.15h⁻¹左右。DO-stat-pH-stat 组合流加:所谓组合流加,即在发酵开始阶段,首先采用 DO-stat 流加培养,方法与上述相同,当

设备供氧达到极限后,改用 pH-stat 方法培养,即用葡萄糖的流加代替酸,控制发酵过程中的 pH,维持在 7.0 左右,直到发酵结束。

1.2.2 分析方法:

菌体浓度测定:发酵液取样 10mL,10 000r/min 4℃ 冷冻离心 10min 后,称量菌体湿重。

葡萄糖浓度测定:发酵液 10 000 r/min 4℃ 冷冻离心 10min 后,取上清葡萄糖试剂盒(上海生物制品研究所)检测。

乙酸浓度测定:取 1mL 发酵液 10 000 r/min 4℃ 冷冻离心 10min,取上清液 0.50mL,加入 0.3g NaCl、0.10mL 2.3mol/L H₂SO₄、2.5mL 乙醚,在振荡器上混合 1min,5 000 r/min 离心 3min,取乙醚相 1mL 加 0.20mL 0.10mol/L NaOH 混合 1min,5 000 r/min 离心 3min,吸弃上层乙醚后置干燥器内干燥,再加入 0.40mL 0.05mol/L (NH₄)₂PO₄(pH2.6)溶解,10 000 r/min 离心 10min,取 5 μ L 进样,HPLC(Agilent 1100) 250mm \times 4.6mm C₁₈ 柱(Agilent 公司)210nm 检测。

TRAIL 蛋白表达测定与计算:取离心后菌体,PBS 清洗 2 次,将菌体按 1:10(W/V)悬浮于 PBS 中,超声波破碎 200W、200s 后(新芝科器),10 000 r/min 4℃ 冷冻离心 15min,取上清,作 SDS-PAGE 凝胶电泳,采用凝胶扫描系统(复日科技)扫描测定纯度,同时采用 Bradford 试剂盒(Bio-Rad)检测样品中菌体总蛋白浓度。可溶性 TRAIL 蛋白的浓度 = 上清中总蛋白浓度 \times 可溶性 TRAIL 蛋白占上清总蛋白的比例。

TRAIL 蛋白的初步纯化:收集菌体后,用含有 20 mmol/L EDTA 的 50mmol/L PBS(pH = 7.4)溶解进行超声破菌,离心后,上清蛋白直接过镍金属亲和层析柱(Qiagen)分离,收集目标峰后再过 CM-Sepharose(Pharmacia)柱,最终蛋白纯度可达 95%。

TRAIL 蛋白活性测定:采用 MTT 法测定蛋白生物活性。在 96 孔板中,每孔接种 200 μ L 的胰腺癌 1990 细胞培养液(2 \times 10⁴ 个),培养 10h 后加入可溶性 TRAIL 蛋白液,18h 后加入 20 μ L 5mg/mL 的 MTT,继续培养 4h 后吸弃培养上清液,再加入 150 μ L DM-SO,振荡 10min 使结晶物充分溶解,酶标仪比色(Sigma)。

2 结果与讨论

2.1 摇瓶实验

2.1.1 乙酸浓度对可溶蛋白表达的影响:从图 1 中可以看出,乙酸离子的存在严重抑制了 TRAIL 蛋白的表达,因此菌体达到高密度并开始诱导以后,能

否在菌体的诱导阶段避免乙酸的积累,成为是否能够真正实现高表达的关键。

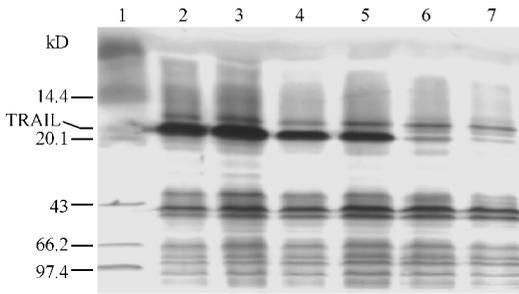


图1 蛋白表达量和乙酸浓度的关系

Fig.1 Expression of soluble TRAIL at different concentration of acetic sodium

1: protein marker 2 3 4 5 6 7: soluble TRAIL protein after induction in the 0, 0.5, 10, 15, 20g/L acetic sodium medium respectively

2.1.2 诱导时间的确定:在摇瓶实验中,我们发现诱导4h后,可溶性 TRAIL 蛋白的表达量不再增加,这个结果在此后的发酵罐实验中得到了验证(数据没有显示),因此在下面的实验中,诱导时间均为4h。

2.2 菌体生长情况

2.2.1 间歇流加培养:接种后,溶氧和 pH 值持续下降,大约 8h 以后,伴随着溶氧和 pH 值的突然上升,表明葡萄糖已经耗尽,此时可以开始补料,加入葡萄糖和氮源以后,溶氧迅速下降,菌体利用以后,溶氧又再次反弹。间歇流加造成较大的溶氧振荡,同时易产生大量乙酸,生长过程不稳定,不利于菌体的持续稳定增长,也不利于发酵在线调控。发酵过程中溶氧、转速、菌体密度以及乙酸的变化,见图 2、图 3。

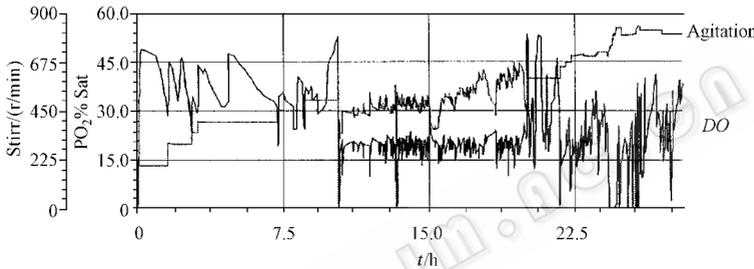


图2 发酵过程中溶解氧和转速的变化

Fig.2 The change of dissolved oxygen and agitation during the fermentation with discontinuous feeding

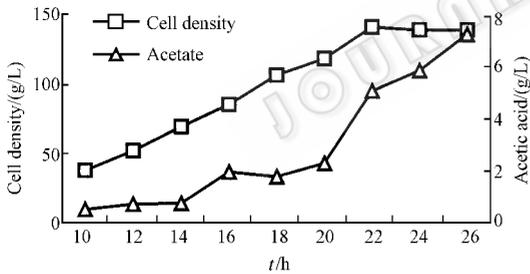


图3 发酵过程中菌体密度、乙酸积累的变化曲线

Fig.3 The change of cell density and acetate concentration during the fermentation with discontinuous feeding

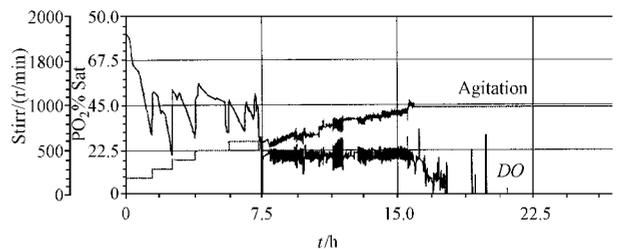


图4 发酵过程中溶解氧和转速的变化

Fig.4 The change of dissolved oxygen and agitation during DO-stat fermentation

2.2.2 DO-stat 培养:接种后 8h,伴随着溶氧和 pH 值的突然上升,开始补料,串联搅拌和溶氧,控制溶氧 20%,连续流加葡萄糖和氮源,限制菌体的平均比生长速率,控制在 0.15h⁻¹ 左右,菌体得以持续增长,随着菌体浓度的增加,搅拌速度也基本呈线性增加,18h 搅拌达到上限,不再提高补料速度,但仍然无法避免发酵后期和诱导阶段乙酸的严重积累,导致最后几小时菌体浓度略有下降。发酵过程中溶氧、搅拌、菌体密度以及乙酸的变化,见图 4 和图 5。

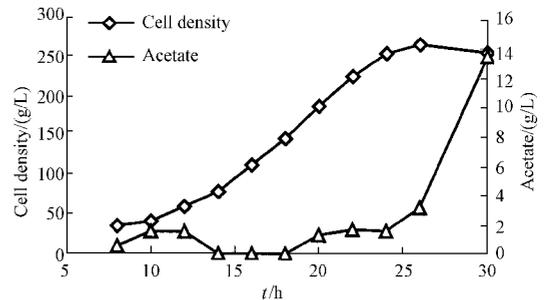


图5 发酵过程中菌体密度、乙酸积累的变化曲线
Fig.5 The change of cell density and acetate concentration during DO-stat fermentation

2.2.3 DO-stat-pH-stat 组合培养:为了解决发酵后期乙酸积累的问题,再次对发酵工艺进行了调整,发

酵前期采用 DO-stat 方式培养,以期得到较快的比生长速率(0.15h⁻¹),当设备的供氧能力达到设备上限以后,采用 pH-stat 的方法调控发酵,即用葡萄糖代

替酸液,控制发酵液 pH 值,当发酵液中葡萄糖浓度较底时,菌体利用氮源,放出氨, pH 值上升,加入葡萄糖后,菌体优先利用葡萄糖,放出大量 CO_2 , pH 值又下降,不断加入葡萄糖,控制 pH 值在 7.0 左右,直到诱导结束。发酵中菌体密度、乙酸浓度和葡萄糖浓度变化,见图 6~8。为了进一步优化表达,我们对比了不同密度下,菌体的表达情况,不难看出,虽然在低密度下表达,可溶性 TRAIL 蛋白的比例有所提高,但总表达量仍然较低,因此,在高密度的前提下,真正实现高表达才是提高产量的关键(见表 1)。

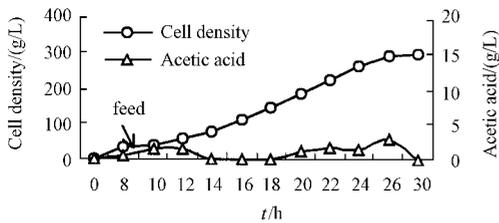


图 6 发酵过程中菌体密度、乙酸积累的变化曲线

Fig. 6 The change of cell density and acetate concentration during the fed-batch cultivation

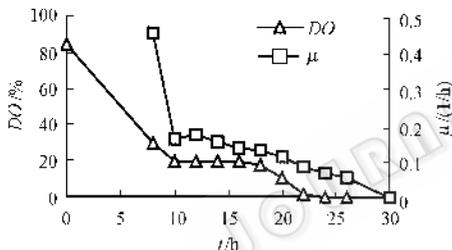


图 7 发酵过程中溶氧和比生长速率的变化曲线

Fig. 7 Effect of dissolved oxygen on specific growth rate during the fed-batch fermentation

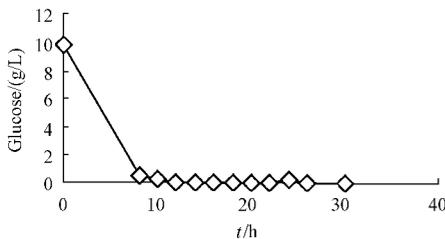


图 8 发酵过程中葡萄糖浓度的变化

Fig. 8 Time profile of glucose concentration during the whole cultivation

从上述几种补料方式的比较结果可以看出,间歇补料培养溶氧振荡较大,发酵曲线混乱,乙酸积累也较多,抑制菌体生长,菌体密度(湿菌)仅为 150g/L。DO-stat 培养克服了间歇补料培养中的许多缺点,例如溶氧大幅振荡、乙酸过量积累等,同时提供了较大

表 1 不同密度下表达量的比较

Table 1 TRAIL production based on different cell density

Cell density/(g/L)	Proportion of soluble TRAIL protein in total protein/%	Expression of soluble TRAIL/(g/L)
157	4.4	0.64
260	3.9	0.92

的初始菌体得率和稳定的生长过程,避免了溶氧的抑制,有利于发酵的在线调控,菌体密度(湿菌)也达到 250g/L。然而,采用 DO-stat 培养,虽然在发酵前期供氧充足的情况下,可以提供较快的生长速度,但是由于设备的供氧能力有限,18h 以后溶氧开始下降,尤其当诱导以后,发酵液粘度增加,泡沫增多,发酵液物理性质的变化引起 K_{La} 的波动,导致比葡萄糖利用速率降低和发酵后期乙酸的积累,乙酸浓度达到 13.5g/L,严重抑制了蛋白的表达,目标蛋白电泳条带几乎不可见。在发酵后期采用 pH-stat 方式补料,在提供菌体营养的同时,可以避免因为葡萄糖浓度过高而导致的乙酸积累,不仅菌体密度在 18h 以后进一步增长,表达量也大大提高。采用 DO-stat-pH-stat 混合培养,菌体密度(湿菌)达到 300g/L,可溶性 TRAIL 蛋白占菌体总蛋白的 4.2%,表达量为 1.1g/L,发酵结束时乙酸浓度接近于 0。

2.3 蛋白的初步纯化

收集菌体以后,TRAIL 蛋白可溶部分通过两步纯化,可以得到纯度为 95% 以上,见图 9。

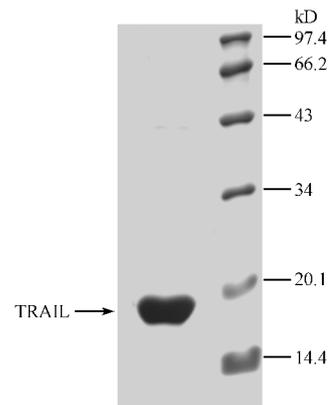


图 9 纯化后的 TRAIL 蛋白

Fig. 9 The SDS-PAGE analysis of purified TRAIL protein

2.4 蛋白活性的检测

采用 MTT 法测定 TRAIL 可溶蛋白的活性,对胰腺癌细胞 1990 有明显杀伤作用, IC_{50} 为 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (数据没有显示)。

3 讨论

高密度发酵技术越来越多的用于实际生产,其关键问题是解决乙酸的积累等问题。

乙酸是大肠杆菌发酵过程中主要的有害副产物,乙酸的积累对 C600/pBV-TRAIL 的生长和蛋白的表达有明显的抑制作用。有文献报道,当比生长速率高于 0.20 h^{-1} (μ_{crit})^[11] 时,就会产生乙酸。利用高密度培养技术,选择合适的补料策略,从而达到控制菌体比生长速率的目的,使菌体的比生长速率不超过 μ_{crit} ,明显减少了乙酸的产生,菌体真正达到高密度。然而,菌体密度的增加,发酵液颜色变深,菌体耗氧增加,使溶氧成为限制因素,可以看出当供氧能力达到设备极限后,比生长速率随之下降,不利于菌体的进一步生长,特别是诱导阶段,发酵环境发生变化,因而引起 K_{La} 的波动,如果不改变相应的调控策略,势必造成乙酸积累增加,影响蛋白的表达。另一方面,我们也能看出,在溶氧下降的情况下,菌体的代谢会发生相应改变,发酵环境非常复杂,乙酸的生成往往是许多因素共同作用的结果,但是只要调控得当,菌体密度仍然可以进一步提高,乙酸的积累也是可以避免的。

实验证明,利用大肠杆菌 C600/pBV-TRAIL 高密度发酵 TRAIL 蛋白,是可行的。我们在整个发酵过程中,并未使用特殊手段,如纯氧、加压等,为工业化创造了条件。通过大量的实验,发酵工艺已经确定,但在高密度发酵的前提下,表达的结果,仍然可以进一步优化,这是我们的后续研究课题。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ. Identification and characterization of a new member of the THF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995, **3**(6): 673 - 682
- [2] Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S *et al.* Induction of apoptosis by a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, 1996, **271**(22): 12687 - 12690
- [3] Riesenber D, Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl Microbial Biotechnol*, 1999, **51**: 422 - 430
- [4] Korz D J, Rinas U, Hellmuth K. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 1995, **39**: 59 - 65
- [5] Sang Yup Lee. High-cell-density culture of *Escherichia coli*. *Tibtech*, 1996, **14**: 98 - 105
- [6] Riesenber D, Menzl K, Sumann K *et al.* High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *Appl Microbial Biotechnol*, 1990, **34**(1): 77 - 87
- [7] Sung Kwan Yoon, Seon Hun Kwon, Kahru A *et al.* Optimization of *Escherichia coli* fed-batch fermentation for bovine somatotropin. *Biotechnology Letters*, 1994, **16**: 1119 - 1124
- [8] Yano T, Kobayashi T, Shimizu S. High concentration cultivation of *Candida brassicae* in a fed-batch system. *J Ferment Technol*, 1985, **63**: 415 - 418
- [9] Park YS, Kai K, Iijima S *et al.* Enhance β -gala-ctosidas production by high cell-density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnol Bioeng*, 1992, **40**: 686 - 696
- [10] Castan A, Enfors SO. Characteristics of a DO-controlled fed-batch culture of *Escherichia coli*. *Bioprocess Engineering*, 2000, **22**: 509 - 515
- [11] Paalme T, Tiisma K, Kahru A *et al.* Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnol Bioeng*, 1990, **35**: 312 - 319

High-cell Density Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* for Production of TRAIL by Using a 2-stage Feeding Strategy

ZHANG Yue¹ SHEN Ya-Ling^{1*} XIA Xiao-Xia¹ SUN Ai-You¹ WEI Dong-Zhi^{1*}

ZHOU Jin-Song² ZHANG Guo-Jun² WANG Liang-Hua³ JIAO Bing-Hua³

¹(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Institute of Biochemistry, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

²(Shanghai Trail Bio-technical Co. Ltd, Shanghai 200336, China)

³(Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract *Escherichia coli* was genetically engineered to produce recombinant tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (Apo2L/TRAIL) using a temperature-inducible expression system. To create a fed-batch culture condition that allows efficient production of TRAIL, different feeding strategy including discontinuous, DO-stat and pH-stat feeding strategies were compared. Then, a special 2-stage feeding strategy was developed. High concentration of biomass (300g wet cell weight per liter of culture broth) and active soluble TRAIL protein (1.1g/L) was obtained by applying a high-cell-density cultivation procedure with

the 2-stage feeding strategy .

Cultivation of recombinant *E. coli* was started as a batch process at 30°C and then followed by fed-batch culture when the dissolved oxygen concentration presented a steep increase resulted from the exhaustion of glucose in the medium. At the first phase of fermentation(batch phase), agitation rate was enhanced to control dissolved oxygen at 30 percent . When glucose in the medium was used up , indicated by a sudden rise in pH value and dissolved oxygen , the second phase (fed-batch phase) was started with glucose and nitrogen resource being supplied automatically. At the beginning of fed-batch operation , stirrer rate was cascaded with dissolved oxygen signals to keep it at 20 percent(DO-stat). During the fed-batch phase , glucose was limited to control the specific growth rate under the critical value μ_{crit} to avoid acetic acid excretion. When the stirrer speed arrived at its up-limit , the flow rate of feed was kept constant . In the inducing phase(42°C for 4h) glucose was fed as a pH regulating agent (pH-stat) and the specific growth rate and dissolved oxygen decreased sharply. Aqueous ammonia was used for maintaining pH value at 7.0 throughout the first two phases. In the whole fermentation , acetic acid concentration didn't exceed 2.9 g/L. At the end of the high-cell-density cultivation process , no acetic acid could be detected in the medium. These results indicated that our fed-batch strategy was able to prevent acetate accumulation significantly. Although high cell density has been achieved , the induction process was not optimized satisfactorily and much work should be done further. Furthermore , since no special ways , like pure oxygen , pressure , has been used in our experiments , this efficient approaches would be useful not only in a pilot scale but also in an industry scale.

Finally , simple purification procedure based on immobilized metal affinity column (IMAC) and CM-Sepharose column was implemented to isolate the TRAIL. Yields of more than 800mg TRAIL per liter of culture broth were obtained , the final purity reaching more than 95% . The purified TRAIL showed strong cytotoxicity activity against human pancreatic 1990 tumor cells , with ED_{50} about 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Key words Fed-batch , fermentation , *Escherichia coli* , TRAIL , purification

Received : 10-29-2003

This work was supported by Grant from the Key Subject of Chinese High-tech Program(No.2002AA2Z345A).

* Corresponding author. Tel 86-21-64250068 ; Fax 86-21-64250068 ; E-mail :dzhwei@ecust.edu.cn